MutaCHIP® OSTEO

DNA-Makroarray Testkit für die Untersuchung der genetischen Prädisposition für Osteoporose

IVD

Nur für in-vitro Diagnostik

CE

SN KF391010 Σ 10

SN KF390010 Σ 20

Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany
www.immundiagnostik.com Tel.: +49 (0)6251/ 701900
info@immundiagnostik.com Fax: +49 (0)6251/ 849430

Inhaltsverzeichnis

1 Verwendungszweck 3

2 Einleitung 3

3 Testprinzip 4

4 Kitbestandteile 5

5 Erforderliche Materialien 5

6 Lagerung und Haltbarkeit 5

7 Arbeitsbedingungen 6

8 Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen 6

9 Probengewinnung 6

10 Testdurchführung 7

1 PCR Produktherstellung 7

2 Probenzusammenführung und Verdünnung 7

3 MutaChip Protokoll 8

11 Auswertung 9

12 Troubleshooting 13

© 2013 Immundiagnostik AG / Version 1.0

1 Verwendungszweck

Der MutaCHIP® OSTEO Test ist ein molekularbiologischer Test zur Untersuchung von Mutationen in Genen, die zu Osteoporose führen können. Die untersuchten Genvarianten stehen im Zusammenhang mit dem endokrinen Vitamin D, endokrinen Östrogen und dem RANKL-RANK-OPG System sowie dem Knochenumsatz. Für diesen Test wird genomische DNA mittels DNA-Makroarray Technologie untersucht. Folgende Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. single-nucleotide polymorphisms, SNP) und Mutationen werden auf dem MutaCHIP® OSTEO untersucht:

Eigenschaft	Gen	Variation	rsNummer
Vitamin D endokrines System	VDR	FokI	rs2228570
		BsmI	rs1544410
	CYP24A1	E143del	-
		R159Q	-
		E322K	-
		R396W	rs114368325
		L409S	rs 6068812
		A457fsX490	-
Estrogen endokrines System	ESR1	XbaI	rs 9340799
		PvuII	rs 2234693
RANK/RANKL/OPG System	TNFRS11B	A-163G	rs 3102735
		G-245T	rs 3134069
Knochenumsatz	COL1A1	Sp1	rs1800012
	BGLAP	T-198C	rs1800247
		C>T	rs1543294
	CALCR	AluI	Rs1801197
	KL	C>A	rs 577912

Durch eine Genotypisierung dieser Mutationen werden diejenigen Personen diagnostiziert, die ein erhöhtes Risiko haben an Osteoporose zu erkranken.

2 Einleitung

Osteoporose ist eine weit verbreitete Krankheit des Skeletts und charakterisiert durch eine niedrige Knochenmineraldichte (engl. bone mineral density, BMD) und Defekten in der Mikroarchitektur des Knochengewebes. Dies resultiert in einer verminderten Knochenstärke und führt damit zu einer erhöhten Anfälligkeit für Frakturen. Osteoporose kann auftreten wenn (1) die maximale Knochendichte nicht erreicht wird oder (2) bei überhöhtem Knochenabbau sowie (3) bei vermindertem Knochenaufbau während der ständig ablaufenden natürlichen Knochenremodellierung. Jedoch ist das Auftreten von

brüchigem Knochengewebe meistens durch ein Zusammenspiel dieser Mechanismen bedingt.
Hormone spielen eine wichtige Rolle für den Erhalt der Knochenmasse. So führt z.B. die Reduzierung der Östrogen Produktion bei postmenopausalen Frauen zu erhöhtem Knochenabbau. Ein weiterer wichtiger Faktor ist der Kalzium Metabolismus. Ein Mangel an Kalzium, oder auch Vitamin D, kann in einem verminderten Knochenaufbau resultieren. Der Kalzium Spiegel im Blut wird durch die Hormone Parathormon (PTH) und Calcitonin reguliert. PTH aktiviert Osteoklasten und fördert somit den Knochenabbau, während Calcitonin auf Osteoblasten wirkt und den Knochenaufbau verstärkt. Ein weiterer Mechanismus der den Knochenauf- und abbau reguliert ist das RANKL-RANK-OPG System. Osteoblasten produzieren RANKL, einen Liganden für den Rezeptor Aktivator von NF-κB (RANK) auf hämatopoetischen Stammzellen, was die Differenzierung von Osteoklasten aktiviert und deren Funktion aufrechterhält. Zusätzlich produzieren Osteoblasten Osteoprotegerin (OPG, auch bekannt als TNFRSF11B), einen Köderrezeptor, der die RANK/RANKL Interaktion blockiert. Das RANKL/OPG Verhältnis ist einer der Schüsselfaktoren für die Aufrechterhaltung des normalen Knochenumsatzes und der Knochenmasse bzw. -stärke.
Neben dem Alter und dem Geschlecht beeinflussen zahlreiche Umweltfaktoren das Risiko an Osteoporose zu erkranken. Diese sind zum Beispiel Ernährung, körperliche Aktivität, Einnahme von Medikamenten und gleichzeitig bestehende andere Krankheiten. Einer der wichtigsten klinischen Risikofaktoren ist jedoch eine positive Familiengeschichte, was die Bedeutung der Genetik in der Pathogenese unterstreicht. Dies erklärt auch die Heterogenität von Osteoporose, die nicht nur auf Unterschiede in der Produktion von systemischen und lokalen Regulatoren, sondern auch in Änderungen in Rezeptoren, Signalwegen, Transkriptionsfaktoren, Enzymen oder Strukturproteinen begründet ist.
Bisher konnten durch genomweite Assoziationsstudien und Kopplungsanalysen zahlreiche Gene identifiziert werden, die eine signifikante oder suggestive Erkrankungsassoziation für das Krankheitsbild der Osteoporose aufzeigen.

Referenzen:

Ralston S. H., Ultterlinden A. G. Genetics of Osteoporosis. *Endocrine Rev 31* (2010), 629-662.

Zheng H.-F., Spector T. D., Richards J. B. Insights into the genetics of osteoporosis from recent genome-wide association studies. *Expert Rev Mol Med 13* (2011), 1-12.

Raisz L. G. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest 115* (2005), 3318-3325.

Sandhu S. K., Hamson G. The pathogenesis, diagnosis, investigation and management of osteoporosis. *J Clin Pathol 64* (2011), 1042-1050.

Richards J. B, Zheng H.-F., Spector T. D. Genetics of osteoporosis from genome-wide association studies: advances and challenges. *Nature Rev Gen 13* (2012), 576:588

3 Testprinzip

Zur Analyse der Mutationen werden die variablen Bereiche der unterschiedlichen Gene mittels PCR amplifiziert, wobei frisch extrahierte genomische DNA des Patienten als Matrize dient. Das Amplifikationsprodukt wird anschließend auf den MutaCHIP gegeben und nach mitgeliefertem Protokoll bearbeitet. Die Analyse mittels Präzipitationsreaktion lässt eine eindeutige Genotypisierung aller auf den MutaCHIP gespotteten Allele der verschiedenen Gene zu.
Das amplifizierte Produkt wird auf den MutaCHIP gegeben und bindet an den dort immobilisierten Sonden. Durch einen Waschschritt werden unspezifisch gebundene Fragmente wieder entfernt. Im Anschluss wird das Enzym hinzugegeben, welches an den Sonden-Fragment-Komplex bindet. Nach Zugabe des Substrats tritt eine Fällungsreaktion an den Stellen, an denen noch DNA gebunden ist, auf. Das farbige Präzipitat wird mit dem Imagereader detektiert und von der dazugehörigen Software ausgelesen und bewertet.

4 Kitbestandteile

Jedes Testkit enthält die folgenden Reagenzien zur Durchführung von 20 MutaCHIP Assays, sowie eine Gebrauchsanweisung.

Bezeichnung	Gefäßgröße	Menge
PCR Mix A (grüner Deckel)	2 mL Schraubröhre	1
PCR Mix B (gelber Deckel)	2 mL Schraubröhre	1
Polymerase	2 mL Schraubröhre mit Einsatz	1
Hybridisation Buffer	30 mL Plastikgefäß	1
Washing Buffer	60 mL Plastikgefäß	1
Conjugation Mix	4 mL Plastikgefäß	1
Substrate	30 mL Plastikgefäß (braun)	1
DNA Ref	2 mL Schraubgefäß	1
MutaCHIPs	1,5 mL Gefäß	20
Gebrauchsanweisung	/	1

5 Erforderliche Materialien

Benötigte Geräte - von PharmGenomics erhältlich:

- Macroarray Analysing Tool (MAAT):
  - Notebook + OSTEO Genomics Software
  - MutaCHIP Imagereader
  - Thermocycler für PCR (Peqlab Primus 25 advanced)
  - Thermomixer mit Kühlfunktion (BIOR Mixing Block MB-102)

Benötigte Geräte und Verbrauchsmaterialien - nicht mitgeliefert:

- Pipetten:
  - 0.1 - 2.5 µL
  - 0.5 - 10 µL
  - 10 - 200 µL
  - 100 - 500 µL
- 0,2 ml PCR Gefäße (steril)

6 Lagerung und Haltbarkeit

- Alle Komponenten sind bei 2-8 °C zu lagern.
- Das Substrat ist unbedingt vor Lichteinwirkung zu schützen.
- Im Inneren des Beutels befinden sich 5x MutaCHIPs mit jeweils geöffnetem Deckel. Wenn ein Lichtschutzfolien-Beutel geöffnet wurde, müssen die Deckel der darin verbleibenden MutaCHIPs unbedingt geöffnet bleiben, da das Schutzgas entweicht.
- Die MutaCHIPs können im wieder lose (nicht luftdicht) verschlossenen (keine Klebestreifen verwenden!) Lichtschutzfolien-Beutel mehrere Wochen bei

Raumtemperatur (RT) gelagert werden. Dabei einen dunklen und trockenen (vor Feuchtigkeit schützen) Ort zur Aufbewahrung auswählen.
- Um selbst minimale Performanceverluste zu vermeiden, empfehlen wir jedoch den Verbrauch eines geöffneten MutaCHIP Beutels möglichst innerhalb von zwei Wochen!
- Die MutaCHIPs sind gegen direkte Sonneneinstrahlung und Staub zu schützen.

7 Arbeitsbedingungen

- Die MutaCHIPs dürfen niemals zentrifugiert werden.
- Die Oberfläche des MutaCHIPs darf nicht mit der Pipettenspitze berührt werden
- Der MutaCHIP darf nur mit den im Protokoll erwähnten Substanzen verwendet werden.

8 Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Die Vorschriften und Grundsätze für molekularbiologisches Arbeiten müssen eingehalten werden.
- Der Test ist zur Verwendung mit **frisch** extrahierter genomischer DNA aus EDTA-Vollblut als Ausgangsmaterial geeignet. Nur dann können optimale Ergebnisse sichergestellt werden.
- Mischen Sie keine Reagenzien aus unterschiedlichen Lots.
- Die MutaCHIPs sind:
  - nur für den Einmalgebrauch bestimmt
  - nur zur *in-vitro* Diagnostik zu verwenden
- Der MutaCHIP darf während den Arbeitsschritten nicht austrocken!
- Der MutaCHIP ist für den Gebrauch mit dem MAAT und der dazugehörigen Software von PharmGenomics ausgelegt.
- Die Arbeitsschritte zügig durchführen.
- Alle Ausgangslösungen während des Arbeitens kühlen.
- Das MutaCHIP-Gefäß mit zwei Händen öffnen. Dabei ist darauf zu achten, dass kein Druck auf den MutaCHIP ausgeübt wird.

9 Probengewinnung

Als Matrize für die PCR Amplifikation dient genomische DNA aus EDTA-Vollblut. Die DNA-Konzentration sollte zwischen 15-30 ng/µl liegen. Die Reinheit ($OD_{260/280}$) der DNA sollte höher als 1.8 sein.
Für den Assay darf nur hochmolekulare (frisch extrahierte) DNA verwendet werden.

10 Testdurchführung

10.1 PCR Produktherstellung

- Vor Beginn der Arbeiten sollte sichergestellt sein, dass die Arbeitsflächen und eingesetzten Geräte dekontaminiert sind
- Die Komponenten des Kits, die zur Durchführung der PCR benötigt werden, bereitstellen

Zur Amplifikation der Ziel-DNA werden zwei PCR-Ansätze pro Probe benötigt – für jeden Primer Mix einer! Diese werden wie in folgenden Tabellen beschrieben pipettiert.

PCR Mix A:

Bestandteil	Volumen pro 25 µL-Reaktionsansatz
DNA (min. 30 ng – max. 60 ng)	2,0 µL
PCR Mix A (grüner Deckel)	22,8 µL
Polymerase	0,2 µL

PCR Mix B:

Bestandteil	Volumen pro 25 µL-Reaktionsansatz
DNA (min. 30 ng – max. 60 ng)	2,0 µL
PCR Mix B (gelber Deckel)	22,8 µL
Polymerase	0,2 µL

Die Proben in den Thermocycler stellen und das in 10.2 beschriebene PCR Protokoll verwenden.

10.2 Probenzusammenführung und Verdünnung

Das PCR-Protokoll muss für jedes Labor erneut etabliert werden, da die verschiedenen Thermocycler unterschiedliche Heizraten haben. Diese Etablierung entfällt, wenn der empfohlene Thermocycler verwendet wird (Peqlab Primus 25 advanced). Für die Etablierung kann mit dem folgenden Standard-Protokoll begonnen werden:

	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	2	1 x
Denaturierung	94	0,5	35 x
Primer Hybridisierung	58	0,5	
Elongation	72	0,5	
Finale Elongation	72	5	1 x
Store at	8	8	1 x

© 2013 Immundiagnostik AG / Version 1.0 / 19.02.2013

10.3 MutaChip Protokoll

A) Vorbereitung des Hybridisierungspuffers

Falls der Hybridisation Buffer trüb oder flockig geworden ist, kann dieser für wenige Sekunden in der Mikrowelle (240 W) oder in einem Wasserbad erwärmt und durch Schwenken homogenisiert werden, bis er wieder klar ist. Vor dem Verwenden muss der Puffer auf Raumtemperatur (RT) abgekühlt werden.

B) Vorbereitung der DNA Proben

- Thermoshaker auf **51 °C** vorheizen.
- **5 µL** PCR-Produkt A, **5 µL** PCR-Produkt B in ein frisches PCR Reaktionsgefäß überführen und kurz vortexen.
- Die so vorbereitete Probe für **2 min.** bei **95 °C** denaturieren.
- Anschließend die denaturierte Probe mit **100 µL** Hybridisation Buffer auffüllen und durch auf- und abpipettieren mischen.
- Das Gemisch vollständig in den MutaCHIP überführen, ohne dabei den Boden des MutaCHIPs zu berühren.

C) Hybridisierung

- Hybridisieren der Probe bei **51°C**, **550rpm** für **30 min.**

D) Waschschritte nach der Hybridisierung

Den Thermoshaker auf **51 °C** temperiert lassen!
Achtung: Auf korrekte Einstellung des Volumens achten!

- Den Hybridisation Buffer aus Schritt C) vollständig entfernen
- **500 µL** Washing Buffer vorsichtig auf den MutaCHIP pipettieren
- Waschen des MutaCHIPs bei **51 °C**, **550 rpm** für **5 min.**

E) Konjugationsschritt

Den Thermoshaker auf **21 °C** temperieren.
Achtung: Während des Herunterkühlens des Thermoshakers muss der MutaCHIP unbedingt aus dem Shaker entnommen werden! Der Washing Buffer muss auf dem MutaCHIP verbleiben bis die Zieltemperatur erreicht ist!
Achtung: Auf korrekte Einstellung des Volumens achten!

- Den Washing Buffer aus Schritt D) vollständig entfernen
- **100 µL** Conjugation Mix vorsichtig auf den MutaCHIP pipettieren
- Konjugation des MutaCHIPs bei **21 °C**, **550 rpm** für **15 min.**
- Den Conjugation Mix vollständig entfernen
- **500 µL** Washing Buffer vorsichtig auf den MutaCHIP pipettieren

F) Zweiter Waschschritt

Den Thermoshaker auf **21 °C** temperiert lassen.
Achtung: Während des Herunterkühlens des Thermoshakers muss der MutaCHIP unbedingt aus dem Shaker entnommen werden!
Achtung: Auf korrekte Einstellung des Volumens achten!

- Den Conjugation Mix aus Schritt E) vollständig entfernen
- **500 µL** Washing Buffer vorsichtig auf den MutaCHIP pipettieren
- Waschen des MutaCHIPs bei **21 °C**, **550 rpm** für **5 min.**

G) Färbung

Achtung: Auf korrekte Einstellung des Volumens achten! **Der Chip darf während und nach dem Färben nicht geschüttelt werden!**

- Den Washing Buffer aus Schritt F) vollständig entfernen.
- **100 µL** Substrate in den MutaCHIP geben und für **5 min** bei **21 °C** inkubieren. Dazu den MutaCHIP in den Thermoshaker überführen **(keine Schüttelfunktion aktivieren)**
- Danach das Substrate wieder vollständig entfernen (Pipette) und umgehend **500 µl** Washing Buffer hinzugeben

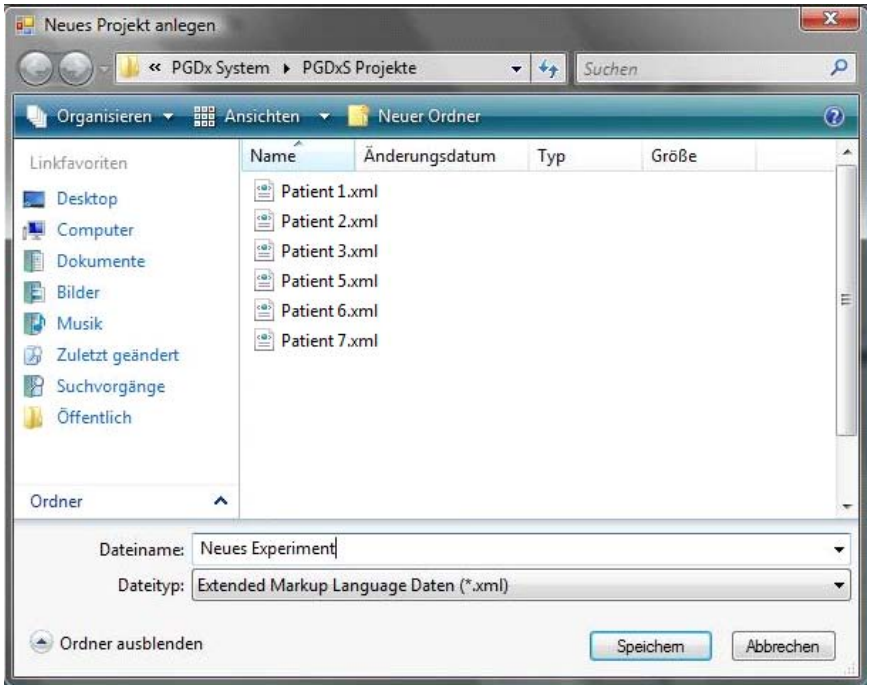
MutaCHIP in den Imagereader überführen (auf korrekte Platzierung achten), Bild erstellen und mit der Analyse/ Auswertung beginnen (siehe folgendes Kapitel)

11 Auswertung

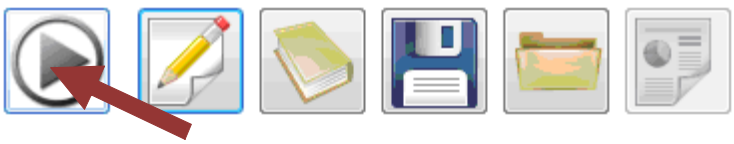
Die Auswertung erfolgt über das MAAT und die OSTEO Genomics Software. Die Ergebnisse werden mit Hilfe der Software in einem Report zusammengestellt. Für die Auswertung des Chips folgen Sie der folgenden kurzen Anleitung. Für weitere und detailliertere Informationen sehen Sie bitte im ARTERO Genomics Software Handbuch nach.

Schritt 1: Ein neues Projekt erstellen

Klicken Sie auf die Schaltfläche *Neues Experiment.* Vergeben Sie einen beliebigen Namen für das Experiment und speichern Sie es anschließend, indem Sie auf die Schaltfläche *Speichern* klicken.

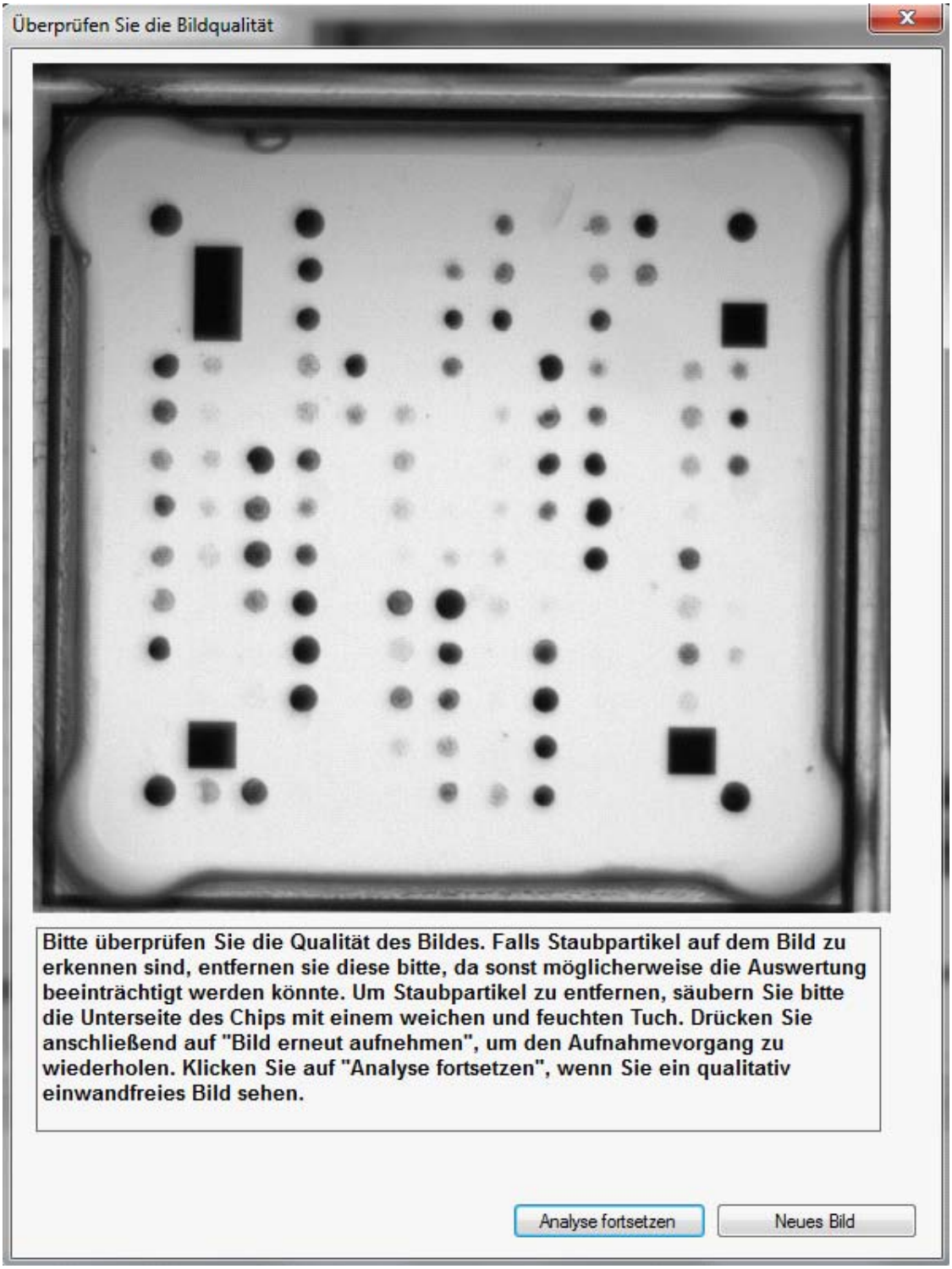


Schritt 2: Analyseprozess starten



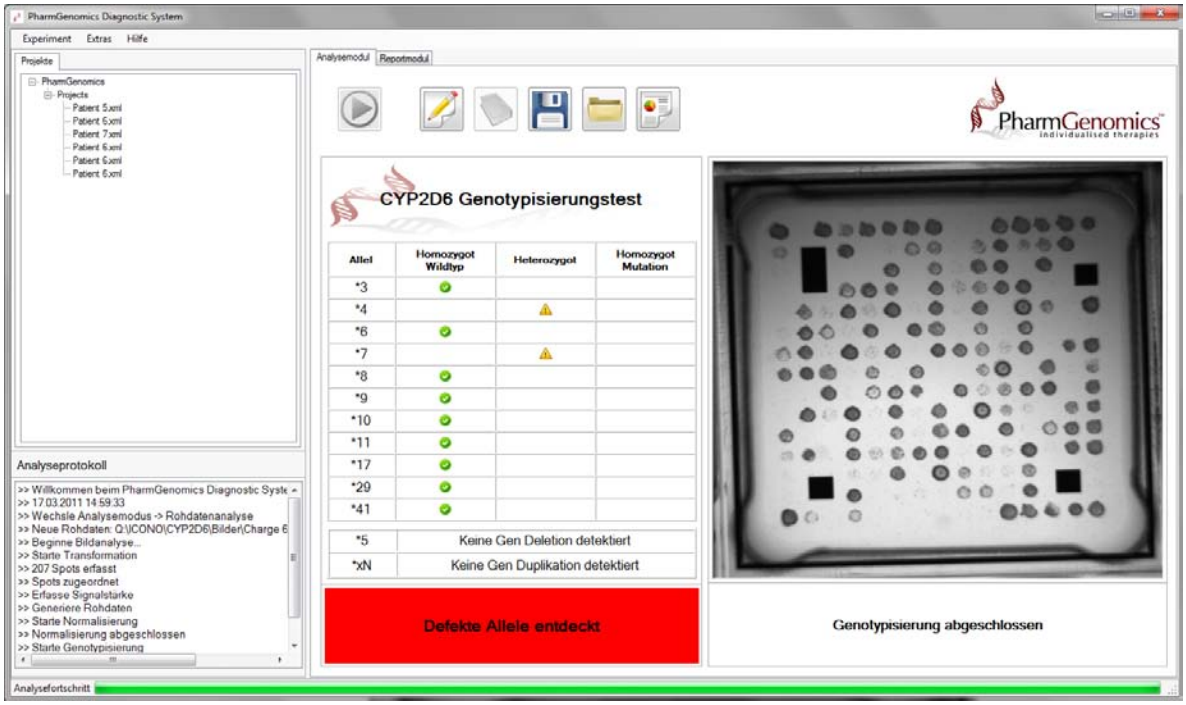
Klicken Sie auf die Schaltfläche *Start*, um die Datenanalyse zu starten.

Schritt 3: Qualitätsprüfung des MutaCHIPs


Überprüfen Sie die Bildqualität
Bitte überprüfen Sie die Qualität des Bildes. Falls Staubpartikel auf dem Bild zu erkennen sind, entfernen sie diese bitte, da sonst möglicherweise die Auswertung beeinträchtigt werden könnte. Um Staubpartikel zu entfernen, säubern Sie bitte die Unterseite des Chips mit einem weichen und feuchten Tuch. Drücken Sie anschließend auf "Bild erneut aufnehmen", um den Aufnahmevorgang zu wiederholen. Klicken Sie auf "Analyse fortsetzen", wenn Sie ein qualitativ einwandfreies Bild sehen.
Analyse fortsetzen
Neues Bild

Um ein einwandfreies Analyseergebnis zu erhalten, muss zunächst die Bildqualität des MutaCHIPs überprüft werden. Staubpartikel auf der Unterseite des MutaCHIPs können die Analyse beinträchtigen. Diese können durch das säubern mit einem weichen und feuchten Tuch entfernt werden. Klicken Sie auf die Schaltfläche Analyse fortsetzen, falls die Bildqualität der in der oberen Abbildung entspricht.

Schritt 4: Genotypisierungsergebnisse



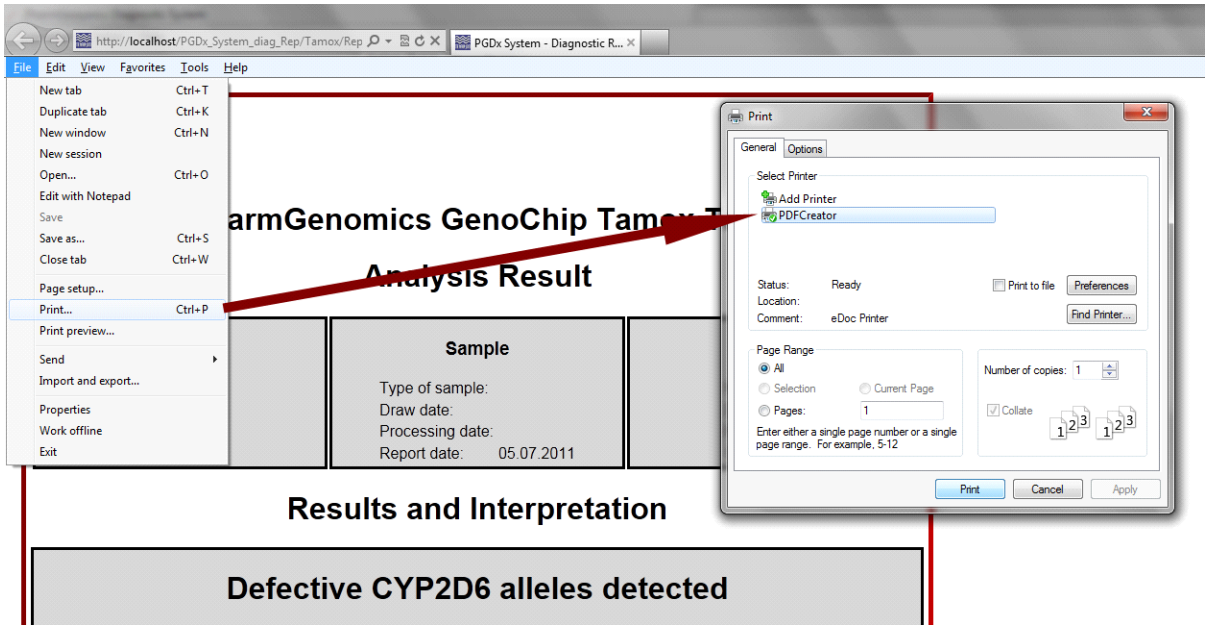
Nach der vollständigen Datenanalyse können Sie die Ergebnisse im Analysemodul / Genotypisierungsmodul oder im Diagnosebericht abrufen. Die dabei verwendete Symbole werden in der unten stehenden Tabelle erläutert.

Symbole der Software und ihre Bedeutung

	Der Patient trägt auf beiden Allelen die gesunde Variante der untersuchten genetischen Variation.
	Der Patient trägt auf einem Allel die gesunde und auf dem anderen Allel die mutierte genetische Variation.
	Der Patient trägt auf beiden Allelen die mutierte genetische Variation in homozygoter Form.
	Die Signalwerte der Sonden für diese genetische Variation sind zu gering, um ein valides Ergebnis zu erzeugen. Dies könnte auf Sequenzveränderungen in direkter Nähe zur untersuchten Variation hindeuten. Die anderen Signale werden jedoch durch den Ausfall nicht beeinträchtigt.
	Beide Sonden für diese genetische Variation erzeugen ein nicht gültiges Signal. Dies könnte auf eine Verschmutzung auf der Chipoberfläche zurückzuführen sein. Die anderen Signale werden jedoch durch den Ausfall nicht beeinträchtigt.

Schritt 5: Diagnostischer Report

Um die Daten auszuwerten, lassen Sie sich den diagnostischen Report anzeigen. Klicken Sie hierfür auf die Schaltfläche *Report*.
Zusätzlich können Sie auch ein .pdf Dokument erstellen oder den Report direkt ausdrucken.



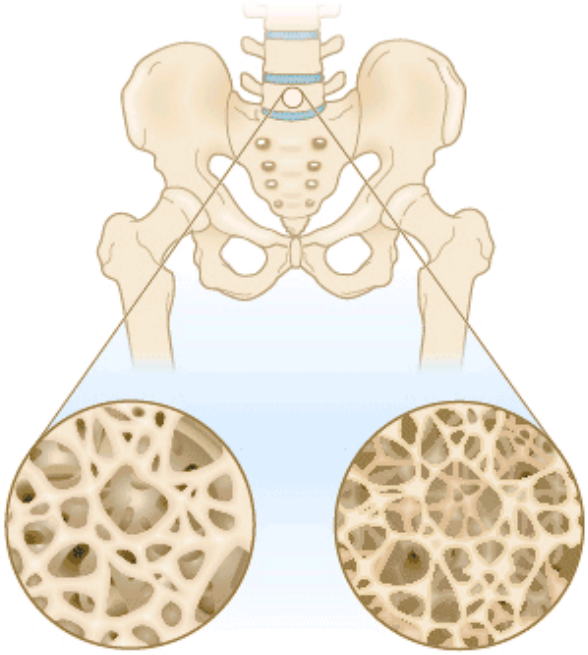
12 Troubleshooting

Problem	Lösung
Software Meldung: Warnung! Die Signale des Biotinreferenzmarkers sind zu niedrig. Dies kann ein Zeichen für einen fehlgeschlagenen oder nicht ausgeführten Konjugationsschritt sein oder das Enzym ist nicht mehr funktional. Das System muss gestoppt werden.	Prüfen Sie das Enzym und/oder Substrat. Wiederholen Sie den Assay mit neuem Enzym/Substrat.
Software Meldung: keine Fehlerangabe ErrorCode - 3011	Der Reader ist nicht richtig angeschlossen. Halten Sie „Esc“ für 3 Sekunden gedrückt und schließen Sie den Reader in der richtigen Art und Weise an - bitte wenden Sie sich an das Benutzerhandbuch des PGDx-Systems.
Schlechte Bildqualität	Reinigen Sie die Bodenunterseite des Arraygefäßes. Benutzen Sie ein weichesTuch, das mit Desinfektionsmittel angefeuchtet ist. Wiederholen Sie das Foto (es kann notwendig sein diesen Schritt mehrfach zu wiederholen).
Unscharfes Bild	Reinigen Sie vorsichtig die Kamera mit einem Tuch oder einem Wattstäbchen.

© 2013 Immundiagnostik AG / Version 1.0 / 19.02.2013

MutaCHIP® OSTEO

DNA macroarray Kit for the Detection of a genetic predisposition towards Osteoporosis



IVD

For invitro diagnostics only

CE

SN KF391010 Σ 10

SN KF390010 Σ 20

Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany
www.immundiagnostik.com Tel.: +49 (0)6251/ 701900
info@immundiagnostik.com Fax: +49 (0)6251/ 849430

Inhaltsverzeichnis

1 Application 3

2 Introduction 3

3 Concept of the Assay 5

4 Components 5

5 Materials 6

6 Storage and Shelf life 6

7 Working Conditions 6

8 Considerations and Precautions 7

9 Sample Collection 7

10 Test Procedure 8

1 PCR Product Generation 8

2 PCR Protocol 9

3 MutaCHIP Protocol 10

11 Evaluation and Interpretation of Results 11

12 Trouble shooting 15

© 2013 Immundiagnostik AG / Version 2.0

1 Application

The MutaCHIP® OSTEO kit is a biomolecular test for the detection of mutations potentially leading to osteoporosis. The genetic variations examined are related to the endocrine vitamin D, endocrine oestrogen and the RANKL-RANK-OPG system as well as the bone turnover. Genomic DNA is used for the analysis by means of a DNA macroarray.

2 Introduction

Osteoporosis is a widespread disease affecting the skeleton. It is characterised by low bone mineral density (BMD) and defects in the bone's micro architecture resulting in lower bone strength and increased susceptibility to fractures. Osteoporosis can arise if either (1) the maximal bone density is not reached or (2) there is an exaggerated bone resorption and (3) there is reduced bone formation during the constant process of bone remodelling. However, the occurrence of fragile bone tissue is usually caused by interplay of all these mechanisms.
Hormones play an essential role in the preservation of bone mass, for example oestrogen reduction leads to increased bone resorption in postmenopausal women. Another important element is the calcium metabolism. A deficit in calcium, and vitamin D as well, might result in reduced bone formation. Calcium levels in the blood are regulated by the hormones parathyroid hormone (PTH) and calcitonin. PTH activates osteoclasts stimulating bone formation, while calcitnonin affects osteoblasts enforcing bone resorption. A further mechanism influencing bone formation and resorption is the RANKL-RANK-OPG signalling pathway. Osteoblasts produce RANKL, a ligand for the receptor activator of NF-κB (RANK) on haematopoietic stem cells. Binding of RANKL to RANK initiates differentiation of osteoclasts, maintaining their function. Additionally osteoblasts produce osteoprotegerin (OPG, also known as TNFRSF11B), a decoy receptor blocking the RANK/RANKL interaction. The RANKL/OPG ratio is one of the key factors to maintaining a normal bone turnover, leading to a healthy bone mass and strength respectively.
Apart from age and gender, several environmental factors have an impact on osteoporosis risk. These include diet, physical activity, medications and concomitant diseases. However, one of the most important risk factors is a family history of osteoporosis, underlining the relevance of genetics for its pathogenesis. It also offers an explanation to the heterogeneity of the disease, which does not solely result from differences in systemic and local regulators, but rather has its causes in receptors, signalling pathways, transcription factors, enzymes or structural proteins.
So far, genome-wide association studies and linkage analyses have identified a number of genes which have a significant, or at least a suggestive, association towards the clinical picture of osteoporosis. The following single nucleotide polymorphisms (SNP) and mutations are covered by the MutaCHIP® OSTEO:

Character	Gene	Variation	rs number
Vitamin D endocrine system	VDR	FokI	rs2228570
		BsmI	rs1544410
	CYP24A1	E143del	-
		R159Q	-
		E322K	-

Character	Gene	Variation	rs number
		R396W	rs114368325
		L409S	rs 6068812
		A457fsX490	-
Oestrogen endocrine system	ESR1	XbaI	rs 9340799
		PvuII	rs 2234693
RANK/RANKL/OPG signalling pathway	TNFRS11B	A-163G	rs 3102735
		G-245T	rs 3134069
Bone turnover	COL1A1	Sp1	rs1800012
	BGLAP	T-198C	rs1800247
		C>T	rs1543294
	CALCR	AluI	Rs1801197
	KL	C>A	rs 577912

By genotyping these mutations, individuals at an increased risk for developing osteoporosis can be identified.

References:

- Ralston S. H., Ultterlinden A. G. Genetics of Osteoporosis. *Endocrine Rev 31* (2010), 629-662.
- Zheng H.-F., Spector T. D., Richards J. B. Insights into the genetics of osteoporosis from recent genome-wide association studies. *Expert Rev Mol Med 13* (2011), 1-12.
- Raisz L. G. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest 115* (2005), 3318-3325.
- Sandhu S. K., Hamson G. The pathogenesis, diagnosis, investigation and management of osteoporosis. *J Clin Pathol 64* (2011), 1042-1050.
- Richards J. B, Zheng H.-F., Spector T. D. Genetics of osteoporosis from genome-wide association studies: advances and challenges. *Nature Rev Gen 13* (2012), 576:588

3 Concept of the Assay

To analyse the mutations a PCR is performed, which amplifies the relevant genes using freshly extracted genomic DNA as template. The amplification product is transferred to the MutaCHIP and is treated following the provided protocol. The analysis allows distinct genotyping of all variants of the amplified genes that are spotted onto the MutaCHIP.
The amplified product binds onto the MutaCHIP to the immobilised probes. In a washing step the unspecific fragments are removed from the surface. Subsequently, the Enzyme Mix is added to the MutaCHIP, coupling with the probe-target complex. After addition of the substrate, a precipitate will form. This precipitate is then detected by the Image reader and the signals are evaluated by the software.

4 Components

Each test kit contains the following components for 10 (20) MutaCHIP Tamox assays and the instruction manual:

Description	Size of Reaction Tube or Flask	Number
PCR Mix A **(green lid)**	2 mL Reaction Tube	1
PCR Mix B **(yellow lid)**	2 mL Reaction Tube	1
Polymerase **(purple lid)**	2 mL Reaction Tube	1
Hybridisation Buffer	30 mL Reaction Tube	1
Washing Buffer	60 mL Plastic Flask	1
Conjugation Mix	4 mL Plastic Flask	1
Substrate	2 mL Reaction Tube (brown)	1 (2)
DNA Ref	2 mL Reaction Tube	1
MutaCHIPs	1.5 mL Reaction Tube	10 (20)
Instruction manual	/	1

5 Materials

Required materials that can be ordered separately from PharmGenomics:

- Macroarray Analysing Tools (MAAT):
  - Notebook + CYP2D6 Genotyping Software
  - MutaCHIP image reader
  - Thermocycler (Peqlab Primus 25 advanced)
  - Thermoshaker with cooling function(BIOR Mixing Block MB-102)

Required Materials – not provided

- pipettes:
  - 0.1 - 2.5 µL
  - 05 - 10 µL
  - 10 - 200 µL
  - 100 - 500 µL
- 0.2 mL PCR tubes (sterile)

6 Storage and Shelf life

- All components are stored at 2-8 °C.
- The substrate has to be strictly protected against light exposure.
- The bags contain each 5x MutaCHIPs with open lids. After unsealing a bag, the lids of the remaining MutaCHIPs have to remain open as the protection gas escapes.
- The MutaCHIPs can be stored in the loosely (not airtight) closed (do not use tape) light-protection bag up to several weeks and room temperature (RT). For storage choose a dry and dark place.
- To avoid even minimal loss of performance, we recommend using up one bag of MutaCHIPs within two weeks.
- The MutaCHIPs have to be protected against direct exposure to sunlight and dust.

7 Working Conditions

- Never centrifuge the MutaCHIPs.
- Do not touch the surface of the MutaCHIPs with a pipette.
- Use only substances that are mentioned in the protocol.

8 Considerations and Precautions

The guidelines and principles for working in a biomolecular laboratory have to be followed.

- The test is suitable for genomic DNA **freshly** extracted from whole EDTA blood as starting material. Only then optimal results are guaranteed.
- Do not mix reagents from different lots.
- The MutaCHIPs are:
  - for single-use only
  - only for *in vitro* diagnostics
- Do not let the MutaCHIP dry out while performing the analysis!
- The MutaCHIP is designed for the use with the MAAT and the software provided by PharmGenomics.
- Perform all steps in a timely manner.
- Keep all stock solutions cooled while working.
- Always open the MutaCHIP with both hands. Do not apply pressure to the tube.

9 Sample Collection

The template for PCR amplification is genomic DNA from EDTA whole blood. The DNA concentration should be between 15 and 30 ng/µL. The minimum DNA purity (A260/A280 ratio) should be higher than OD 260/280 1.8.
For the assay high molecular (freshly extracted) DNA has to be used.

10 Test Procedure

10.1 PCR Product Generation

- Before starting, make sure that all working surfaces and utilized devices are decontaminated.
- Prepare all components of the kit required for the procedure of the PCR

To amplify the target DNA, two reactions have to be prepared. They have to be pipetted following the schemes below:

PCR Mix A:

Component	Volume per 25 µL- reaction mixture
DNA (min. 30 ng - max. 60 ng)	2.0 µL
PCR Mix A **(green lid)**	22.8 µL
Polymerase	0.2 µL

PCR Mix B:

Component	Volume per 25 µL- reaction mixture
DNA (min. 30 ng - max. 60 ng)	2.0 µL
PCR Mix B **(yellow lid)**	22.8 µL
Polymerase	0.2 µL

The samples are placed in the thermocycler and the program described in following section is to be applied.

© 2013 Immundiagnostik AG / Version 2.0 / 06.12.2012

10.2 PCR Protocol

The PCR protocol has to be established anew for each laboratory, as different thermocyclers have different heating rates. This establishment can be omitted when using the recommended thermocycler (Peqlab Primus 25 advanced). The following standard protocol can be used to start the establishing process:

	Temperature [°C]	Time [min]	Cycles
Initial denaturation	94	2	1 x
Denaturation	94	0,5	35 x
Primer hybridisation	58	0,5	
Elongation	72	0,5	
Final elongation	72	5	1 x
Store at	8	8	1 x

10.3 MutaCHIP Protocol

A) Preparation of the Hybridisation Buffer

If the Hybridisation Buffer is turbid or a precipitate can be seen, it has to be heated in a microwave for several seconds (240 W) or in a water bath. Gently shake the Hybridisation Buffer until it gets clear, to homogenise it again. Before usage, it has to be cooled to room temperature (RT).

B) Preparation of DNA samples

- Set the thermoshaker to **51 °C**
- Add **5 µl** of each PCR product (A and B) and vortex briefly
- Denature the DNA at **95°C** for **2 min**
- Add **100 µl** of Hybridization Buffer to the sample
- Load the sample on the MutaCHIP, without touching the bottom of the chip

C) Hybridisation

- Perform the hybridisation at **51°C**, **550 rpm** for 30 **min.**

D) Washing steps after Hybridisation

Caution: Pay attention to the correct adjustment of volume!

- Completely remove the Hybridisation Buffer from step C)
- Add carefully **500 µL** of Washing Buffer onto the MutaCHIP
- Wash the MutaCHIP at **550 rpm** and **51°C** for **5 min**

E) Conjugation step

Set the thermoshaker to **21 °C**.

Note: During the cooling period the MutaCHIP has to be removed from the thermoshaker! The Washing Buffer has to remain on the MutaCHIP until the target temperature is reached!

Caution: Pay attention to the correct adjustment of volume!

- Completely remove the Washing Buffer from step D)
- Add **100 µL** of Conjugation Mix to the MutaCHIP
- Incubate the MutaCHIP at **550 rpm** and **21°C** for **15 min**

F) Washing step after conjugation step

Caution: Pay attention to the correct adjustment of volume!

- Completely remove the Conjugation Mix from step E)
- Add of **500 µL** Washing Buffer to the MutaCHIP
- Wash the MutaCHIP at **550 rpm** and **21°C** for **5 min**

G) Precipitation

Caution: Pay attention to the correct adjustment of volume! **Do not shake the MutaCHIP during the precipitation!**

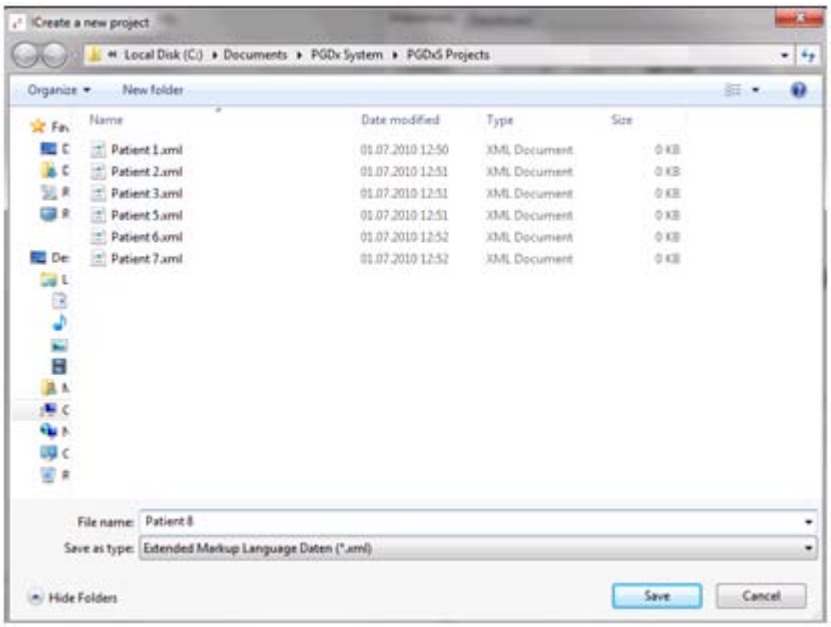
- Completely remove the Washing Buffer from step F)
- Add **100 µL** of Substrate to the MutaCHIP and incubate for **5 min** at **21°C.** To do so, put the MutaCHIP into the thermoshaker **(Do not activate shaking function)**
- Thereafter, remove the Substrate completely (pipette) and immediately add **500 µL** of Washing Buffer
- Place the MutaCHIP into the image reader (pay attention to the correct orientation), take a picture and start with the analysis/evaluation of the results (see following chapter)

11 Evaluation and Interpretation of Results

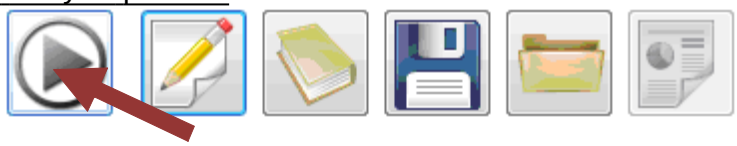
The evaluation is performed using the MAAT and the Osteo Genotyping Software. The results are compiled with help of the software into a report. For the evaluation of the chip, follow the short instructions below. For further and detailed information, please refer to the Osteo Software handbook.

Step 1: Create a new project

Click on the button *New experiment*. Assign an arbitrary name for the experiment and subsequently save it by clicking on the button *save*.

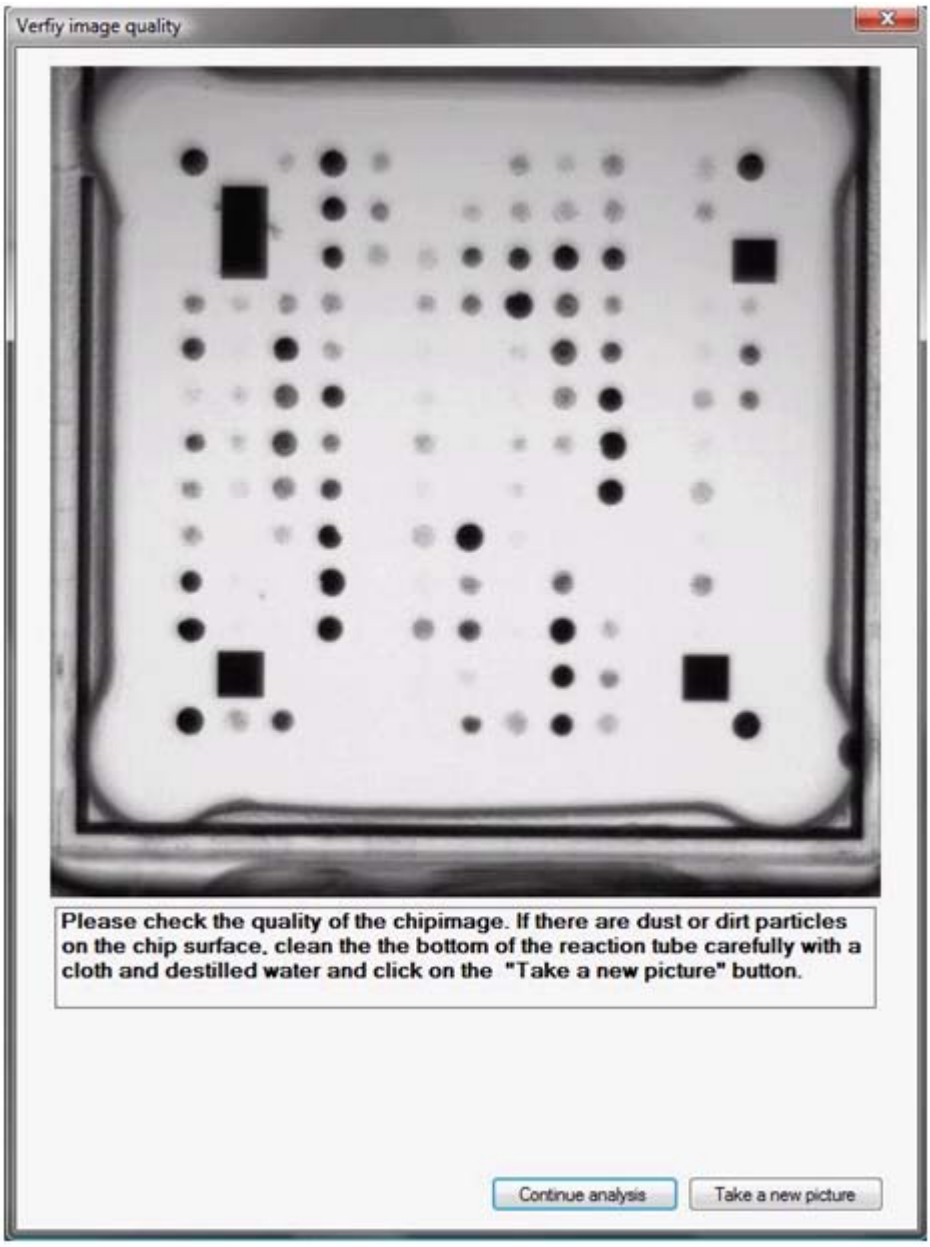


Step 2: Start the analysis process



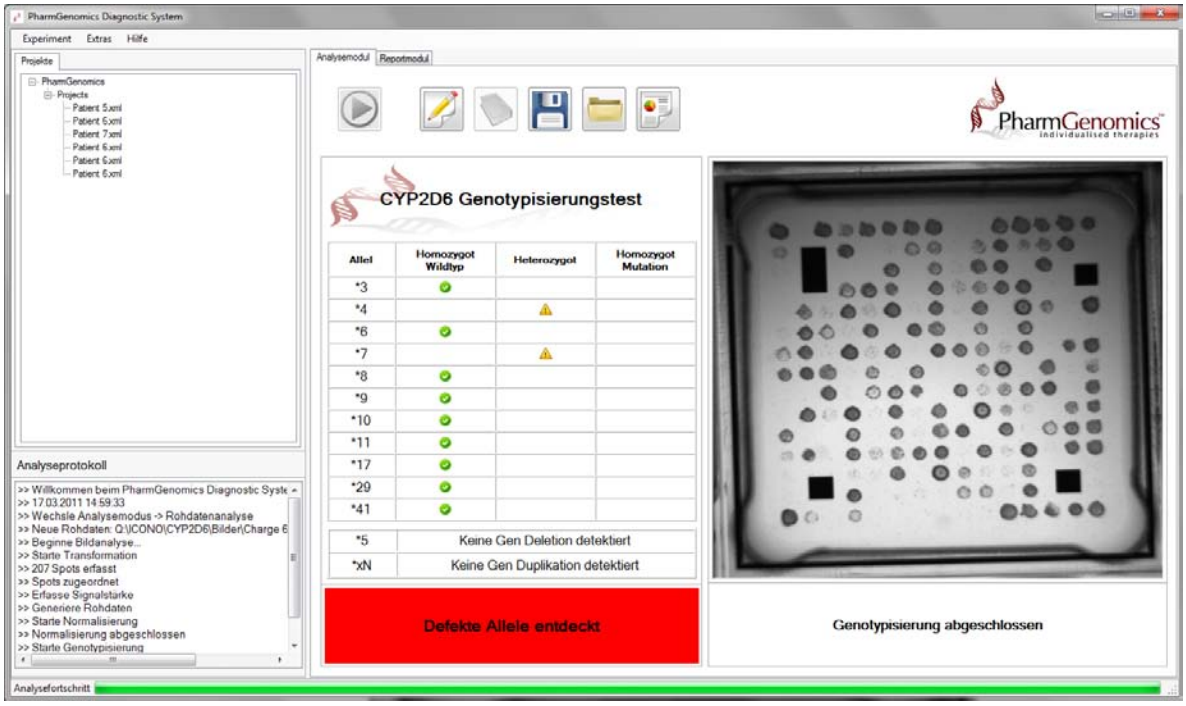
Click on the *Start* button to initiate data analysis.

Step 3: Quality check of the chip


Verfiy image quality
Please check the quality of the chipimage. If there are dust or dirt particles on the chip surface, clean the the bottom of the reaction tube carefully with a cloth and destilled water and click on the "Take a new picture" button.
Continue analysis
Take a new picture

To ensure a correct analysis result, the picture quality of the MutaCHIP has to be checked. Particles of dust on the bottom side of the MutaCHIP can affect the analysis. These can be removed by cleaning with a soft and wet tissue. Follow the instructions given in the screen shown here. Press *Continue analysis* if the quality of the picture is comparable to the figure above.

Step 4: Genotyping results



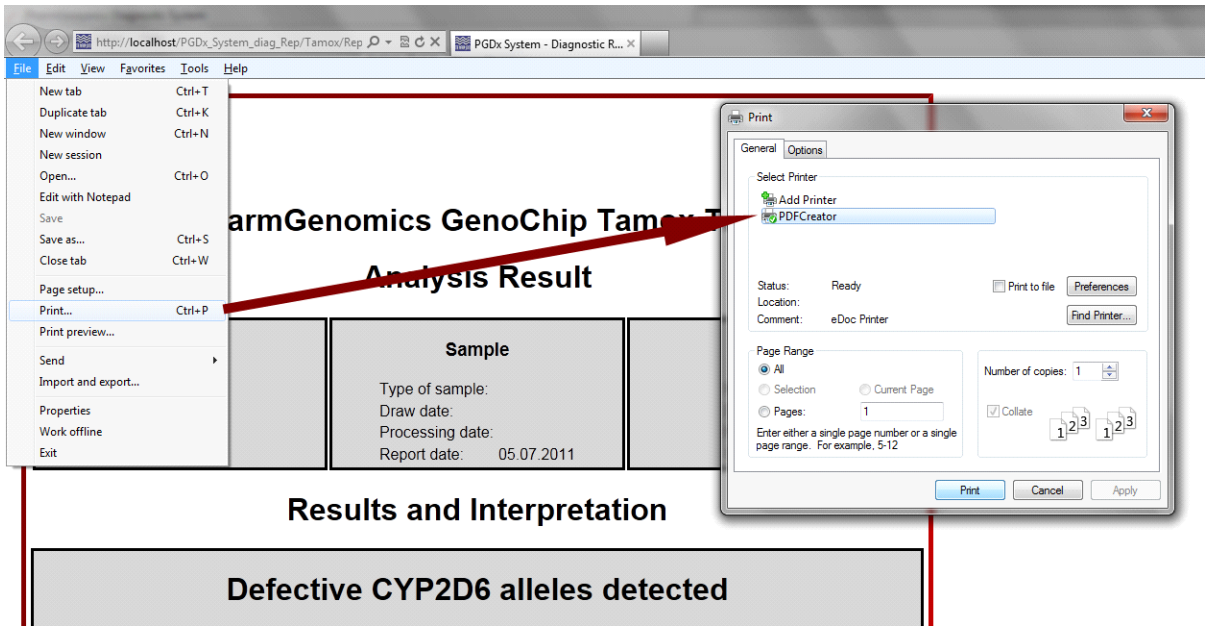
After the complete data analysis, the results can be access in the analysis module / genotyping module or in the diagnostic report (example picture). The used icons are explained in the following table.

Symbole der Software und ihre Bedeutung

	The patient carries on both alleles the healthy variant of the investigated genetic variants.
	The patient carries on one allele the healthy and on the other allele the mutated genetic variant.
	The patient carries on both alleles the mutated genetic variation in homozygous form.
	The signal values of the probes for this genetic variation are too weak for a valid result. This could be caused by other sequence variations in close proximity to the investigated variant. The remaining signals of the assay are not influenced.
	Both probes for this genetic variant show an invalid signal. This might be caused by impurities or dust particles on the MutaCHIP surface. The remaining signals of the assay are not influenced

Step 5: Diagnostic report

To evaluate the results open the diagnostic Report Main. Therefore click on the button *Report*.
Additionally a .pdf document can be created or the report can be directly printed.



12 Trouble shooting

Problem	Solution
Software Message: Warning! The signals of the biotin reference markers are too low. This could be a sign of a failed or missed conjugation step. Alternatively the enzyme could be degraded. The system will be stopped.	Check enzyme and/or substrate. Repeat the assay with new enzyme/ substrate
Software Message: Warning! The signals of the DNA probes indicate a failed amplification. However, there might be a homozygous deletion of the CYP2D6 gene. Please refer to the handbook under section "Detection of *5 homozygous"	Please read paragraph 11.1
Software Message: No error description ErrorCode -3011	The reader is not plugged in properly: Keep “Esc” pressed for 3 seconds and plug in the reader in the right manner – please refer to the user manual of the PGDx System
Poor image quality	Clean the bottom side of the MutaCHIP using a cotton swab or a cloth wet with disinfectant Repeat the photograph (it can be necessary to repeat this procedure several times)
Blurred picture	Carefully clean the camera with a cotton swab

© 2013 Immundiagnostik AG / Version 2.0 / 18.06.2013